

dr hab. Magdalena Greczek-Stachura prof. UP

Kraków.19.01.2019

Instytut Biologii

Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Solarskiej pt. „Dimorphism and putative sexual reproduction of cryptophytes (Cryptophyceae)” przygotowanej w Instytucie Botaniki im. Władysława Szafera Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem PD dr Kerstin Hoef-Emde

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr Magdaleny Solarskiej przygotowana pod kierunkiem Promotora PD dr Kerstin Hoef-Emden wpisuje się w nurt ważnych badań taksonomicznych mających na celu oznaczenie taksonów i identyfikację gatunków kryptofitów (Cryptophyceae) - jednokomórkowych glonów występujących głównie w środowisku wodnym. Autorka podejmuje bardzo interesujący problem rozmnażania płciowego oraz związanego z tym zjawiskiem dymorfizmu u kryptofitów.

Przedstawiona do recenzji w języku angielskim rozprawa doktorska ma układ powszechnie stosowany w pracach doświadczalnych i zawiera 130 stron maszynopisu, 44 figury, 18 tabel i dodatkową tabelę w załączniku. Praca ma logiczny układ i czyta się ją ze zrozumieniem poszczególnych wątków badawczych. Poprzedzona jest spisem treści. Obejmuje następujące rozdziały: Wprowadzenie (6 stron) na które składa się 5 podrozdziałów, Cele pracy i hipotezy badawcze (1 strona), Metody (14 stron) składające się z 12 podrozdziałów, Wyniki (42 strony), Dyskusja (11 stron), Konkluzje zamieszczone na 2 stronach, Streszczenie w języku polskim, Bibliografia obejmująca 152 pozycje literatury (16 stron), Załącznik z tabelą szczepów, Wykaz skrótów stosowanych w pracy podzielony na cztery podrozdziały.

Pierwszy rozdział – „Wprowadzenie”, jest wstępem do dalszych części rozprawy i zawiera ogólną, krótką charakterystykę kryptofytów (Cryptophyceae), historię badań nad systematyką tych mikroorganizmów, obecny stan wiedzy na temat kryptofytów w Polsce oraz porusza zagadnienie dymorfizmu i rozmnażania w tej grupy mikroorganizmów. Brak we wstępie pozycji systematycznej Cryptophyceae w nowej filogenetycznej klasyfikacji eukariotów. Kryptofity są niesłychanie interesującą z punktu widzenia ewolucyjnego grupą mikroorganizmów, w których można wyróżnić cztery eukariotyczne genomy zachowane w komórce w wyniku wtórnej symbiozy. Szkoda, że autorka we wstępie nie przedstawiła zjawiska wtórnej symbiozy i implikacji wynikających z transferu genów w obrębie komórki kryptofitów.

Cele pracy zostały sformułowane rzeczowo i jasno. Autorka postawiła dwie hipotezy badawcze.

Kolejny rozdział – „Metody” jest niezwykle obszerny (24 strony tekstu) zawiera charakterystykę stawów, z których pobierany był materiał do badań wraz z opisem fizykochemicznych parametrów wody pochodzącej z tych zbiorników. W kolejnych podrozdziałach autorka przedstawia opis izolacji kryptofitów oraz metody ich obserwacji przy użyciu mikroskopu świetlnego, transmisyjnego mikroskopu elektronowego i skaningowego mikroskopu elektronowego. Należy podkreślić, że Doktorantka poznała techniki przygotowania i wykonania preparatów, co wymaga pewnego doświadczenia i świadczy o dużym wkładzie pracy autorki. W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisała metody molekularne polegające na sekwencjonowaniu wybranego fragmentu DNA wyizolowanego z komórek kryptofitów oraz omówiła wybrane metody filogenetycznej analizy. W następnym podrozdziale Autorka przedstawiła eksperymenty mające na celu obserwacje zlania gamet i tworzenia diploidnych kampylomorfów na przykładzie *Cryptomonas curvata* szczep M 1999 (CCAC) inkubowanych w mediach o różnym stężeniu fosforu. W ostatnim podrozdziale metod Doktorantka omówiła pomiary zawartości jądrowego DNA w komórkach haploidalnych i diploidalnych kryptofitów przy zastosowaniu jodku propidyny w cytometrze przepływowym. Opis stosowanych metod badawczych i eksperymentów jest poprawny, podany w sposób wyczerpujący. Dobór metod jest trafny dla realizacji zamierzonych zadań badawczych. Rozdział ten został napisany zgodnie z naukowymi standardami i w sposób wystarczający, aby czytelnik mógł ocenić prawidłowość eksperymentów i wypracować własny pogląd na temat wartości naukowej uzyskanych wyników.

Kolejny rozdział – „Wyniki” jest najobszerniejszy w całej rozprawie. Autorka uzyskała dużo oryginalnych wyników, które zaprezentowała dzieląc ten rozdział na sześć dużych podrozdziałów, dodatkowo bogato udokumentowanych wykresami, tabelami i znakomitymi

mikrofotografiami. Do najważniejszych osiągnięć mgr Magdaleny Solarskiej niewątpliwie należy:

- zaobserwowanie i udokumentowanie fuzji dwóch haploidnych komórek (kryptomorfów) i utworzenie diploidalnej komórki kamyplomorfa
- potwierdzenie ploidalności morfotypów *Cryptomonas obovoidea* na podstawie analizy w cytometrze przepływowym
- ustalenie gatunków kryptofitów i odkrycie w badanych zbiornikach ośmiu szczepów o nieustalonej przynależności gatunkowej na podstawie analizy sekwencji genu kodującego dużą podjednostkę rybosomalnego DNA
- ustalenie morfotypów badanych szczepów *Cryptomonas curvata*, *C. phaseolus*, *C.gyropyrenoidosa*, *C.obovoidea* oraz nieoznaczonych gatunków *Cryptomonas* na podstawie analizy peryplastów w mikroskopie skaningowym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym
- wskazanie konieczności rewizji taksonomicznej rodzaju *Storeatula*, co jest zgodne z morfologiczną obserwacją (gładki peryplast) i z wynikami przeprowadzonej analizy filogenetycznej.

Współczesne badania taksonomiczne mikroorganizmów obejmują zarówno analizę cech morfologicznych jak i genetycznych. Doktorantka posłużyła się metodami molekularnymi i analizowała cechy fenetyczne w celu ustalenia przynależności gatunkowej *Cryptomonas*, co jest niezwykle cenne we współczesnych badaniach bioróżnorodności oraz identyfikacji gatunków kryptycznych.

Dyskusja jest dobrze przeprowadzona, kolejne rozdziały pracy i wyniki Doktorantka omawia w świetle danych z piśmiennictwa. Poszczególne etapy pracy są rzeczowo przedstawione na tle wyników otrzymanych przez innych badaczy. Bardzo interesującym problemem jest rozmnażanie płciowe u kryptofitów. Autorka udokumentowała fuzję kryptomorfów i powstanie diploidalnego kamyplomorfa. Nie przeanalizowano roli światła w wystąpieniu fuzji kryptomorfów, oraz „mating” feromonów gwarantujących wystąpienie procesu tworzenia form diploidalnych. Znane są substancje, które odpowiedzialne są za koniugację np u orzęska *Blepharisma japonicum* jest to związek przypominający serotoninę. U kryptofytów występuje chlorofil a i c₂ oraz karotenoidy takie jak alloksantyna, krokoksantyna czy monadoksantyna. U grzybów (Zygomycetes) poziom karotenoidów jest zależny od ekspozycji na światło a ich biosynteza wzrasta w trakcie interakcji pomiędzy różnymi typami koniugacyjnymi. Stąd też moje pytanie o rolę światła w procesie koniugacji u Cryptophyta.

Doktorantka uzasadnia wybór metod badawczych, które miały na celu uzyskanie odpowiedzi na postawione pytania - jakie gatunki kryptofitów występują w trzech badanych zbiornikach wodnych znajdujących się na terenie Krakowa. W tym celu posłużyła się metodami mikroskopii świetlnej, transmisyjnej i skaningowej. Przedstawione mikrografie są znakomitej jakości i ilustrują cechy diagnostyczne kryptofitów na podstawie których można je oznaczyć.

Doktorantka posłużyła się również metodami biologii molekularnej i na podstawie sekwencji fragmentu genu kodującego LSUrDNA skonstruowała filogram w oparciu o analizę bayesowską (BI), metodę największej wiarygodności (ML) oraz metodę łączenia sąsiadów (NJ). Dopasowanie (alignment) było wykonane za pomocą algorytmu ClustalW. Dlaczego nie zastosowano bardziej precyzyjnego algorytmu np MAFFT? Kolejne pytanie, które kieruję do doktorantki to - czy jeden marker genetyczny wystarczy do udzielenia odpowiedzi na temat filogenezy? Dlaczego nie został wybrany do analizy przynajmniej drugi marker molekularny? Z literatury wiadomo, że struktura drugorzędowa ITS2 jest pomocna w identyfikacji gatunków *Cryptomonas*.

Doktorantka analizowała preferencje sezonowe kryptofitów w badanych zbiornikach oraz jak się zmieniają gatunki w zależności od fizykochemicznych parametrów wody. Z wykresów Fig.16, 17, 18 wynika, że najwięcej izolatów otrzymano w grudniu oraz we wrześniu (lub sierpniu BG), co autorka pracy wiąże ze ogólnym spadkiem jonów. Ten wniosek nie jest zgodny z wynikami przedstawionymi na wykresach. Mierzono wiele parametrów fizykochemicznych jednak przedstawione wyniki nie są skorelowane z pH wody. Z tabeli 15 wynika, że w poszczególnych zbiornikach były znaczne różnice między odnotowaną wartością maksymalną i minimalną, natomiast nie wiadomo jakie były faktyczne wartości pH w trakcie pobierania prób. Nie dokonano również pomiaru temperatury wody, możemy natomiast domyślać się, że temperatura i warunki oświetlenia mają wpływ (co autorka nadmienia) na proces fuzji kryptofitów.

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Solarskiej została przygotowana bardzo starannie. Tekst jest napisany zwięzłym, przejrzystym stylem. Czytanie pracy budzi duże zainteresowanie czytelnika. Uzyskane wyniki w mojej ocenie wnoszą nowe dane dotyczące niezwykle interesującego zjawiska fuzji i przemiany pokoleń w badanej grupie. Przedstawione uwagi i sugestie nie wpływają na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Uważam, że praca jest oryginalnym opracowaniem łączącym spojrzenie naukowca posługującego się stosowanymi w studiach taksonomicznych metodami morfologicznymi i metodami molekularnymi, które

w wielu przypadkach mogą weryfikować znaczenie cech fenetycznych.

Przedstawiona praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Stawiam zatem wniosek do Wysokiej Rady Instytutu Botaniki Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Solarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Magdalena Greczek-Stachura prof. UP